

定量NMR (qNMR)

Technical Details and *TraceCERT™*
Certified Reference Materials



定量 NMR

Technical Details and TraceCERT™ Certified Reference Materials

定量 NMR (qNMR) は、有機化合物を定量するための効率的なツールとして、近年、製薬・化学産業での利用が拡大しています。一般的には、プロトン NMR が使用されていますが、メタボロミクス、バイオマーカー探索、生理学的パスイェなどの新しい分野で qNMR の導入を検討する場合、より複雑な分子やシステムが登場するため、 ^1H -qNMR の使用が難しくなります。このような場合には、他の NMR 活性核種、すなわち ^{31}P や ^{19}F を使用することがより良い選択肢となるでしょう。

2009年、Sigma-Aldrich Switzerland は、ISO/IEC 17025 および ISO Guide 34 の認定を受けて qNMR を使用した有機認証標準物質 (CRM) の製造を開始しました。 ^1H 、 ^{31}P 、 ^{19}F 核の 20 種類以上の qNMR 用内部標準物質を使用し、クロマトグラフィー用 CRM の多くのポートフォリオを構築しており、現在では、農薬、多芳香族炭化水素 (PAH)、フェノール類、可塑剤、化粧品、抗生物質、大気モニタリング物質、天然物、脂肪酸、アミノ酸、など 200 種類以上の有機化合物の製品があります。シグマ アルドリッチは、CRM ユーザーからの貴重な意見を参考にしながら、qNMR の技術を継続的に改良し、最適化しています。

このカタログでは、NMR 装置を使用して定量的な測定を行い、最大限の精度と再現性を得るために役立つ情報を紹介します。また、シグマ アルドリッチが有機化合物の認証に使用している Trace CERT CRM を紹介します。この CRM を使用することで、NMI の一次標準 (例: NIST や NMIJ) にトレーサブル、つまり SI にトレーサブルな信頼性の高い結果を得ることができます。

有機化合物の定量

ほとんどの分析技術は化合物に依存しているため、有機化合物の信頼できる定量は非常に困難な課題です。例えば、UV、DAD、HPLC を使用する場合、全く同じ構造の化合物で、トレーサビリティの確認できる標準物質が必要となります。しかし、ほとんどの有機化合物においてこのような信頼できる標準物質はありません。

そのため有機化合物の含有量は、通常、潜在的な不純物 (関連化合物、水、残留溶媒、無機不純物など) をすべて測定し、100% から不純物の値の合計を差し引くことで算出されます。この方法は、潜在的な不純物が見落とされていないことや、クロマトグラフィー法で測定された関連する不純物が目的成分と同じ反応を示すことを前提としています。しかし、実際にはそうではないことがよくあります。

qNMR はこのように手間のかかる方法に代わって、相対的な一次法として使用することができます。NMR は過去 40 年間、有機化合物の構造を解明するための最も重要な定性分析法の一つでしたが、この 10 年間で定量のための分析法としてさらに重要性を増してきています。

内部標準法と外部標準法

qNMR では、様々な内部および外部標準法がテストされています。Bharti と Roy は、長所と短所を含む様々な方法について大まかな概要を説明しています。¹

外部標準法は、同軸の二重試料管に分析対象物と標準物質を分けて入れ、NMR で測定を行います。また、ERETIC (Electronic REference Toaccess In vivo Concentration) といった、電子的に生成された信号量を基準として用いる電子信号法も考案されています。

CRM を開発する上で、測定の不確かさを低く抑えることは重要な課題であるため、何人かの著者は内部標準法について述べています^{3,4,5}。

例えば、非常に貴重なサンプルや高価な物質などを分析する場合には、分析対象物の回収が容易であることが重要となるため、外部標準法に利点があります。しかし、内部標準法は、より高い精度と低い不確かさを実現することができます。材料を同じバイアルに秤量した後は、分析対象物とリファレンスの比率は同じままです。外部標準法とは対照的に、添加される溶媒の量、つまり溶液の濃度は、定量計算にとって重要ではありません。そのため、我々は通常、内部標準法を採用しています (図 1)。

ステップ・バイ・ステップで考慮すべきこと

以下の推奨事項は主に内部標準法に関するものですが、外部標準法にも同様に考えられます。

1. 適切な標準物質の選択

高純度	→ オーバーラップが最小限
吸湿性、揮発性がない	→ 安定性の確保と計量の容易さ
残留水分がない	→ ベースラインへの影響を最小限に抑える
様々な重水素化 NMR 溶媒に高い溶解性を示す	→ ユニークで安定したシグナルとケミカルシフトを提供
シグナルの数が少ないことが望ましい	→ 分析対象物の信号との重なりを最小限に抑える

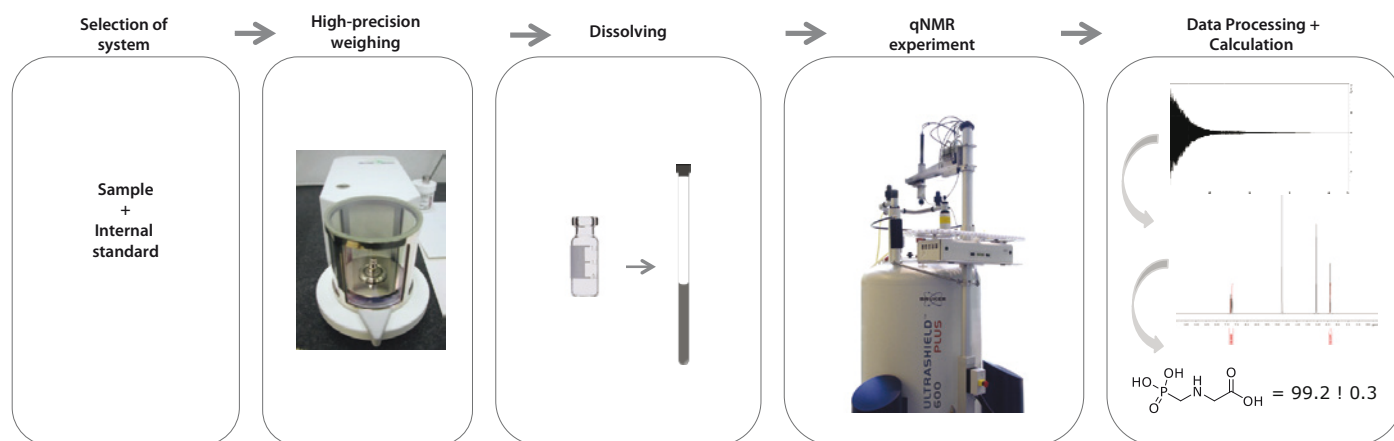


図 1: General procedure of a qNMR experiment using an internal standard

サンプルによって選択する標準物質は異なりますが、スペクトル中の各化合物から1つのよく分離された信号があれば十分です。正確かつ精密な qNMR 測定を行うためには、信号強度比が 1:1 であることが推奨されますが、必須ではありません。

シグマ アルドリッチ NMR **TraceCERT™** シリーズ (5ページ参照) はすべて、要求される特性を満たし、NIST SRM または NMIJ SRM にトレーサブルであり、qNMR 分析の CRM として採用することができます。

2. 互換性の確認

適切な標準物質を選択した後、特にここで説明する内部標準法の場合は、サンプルと標準物質や溶媒との反応を避けるために、混合物の化学的安定性と不活性度を確認する必要があります。NMR のテストにおいて $t=0$ で実験を実行し、2 回目に、計画されたすべての繰り返しの予想実験時間 (例: $t=5$ 、12、24 時間) を含む測定を行うことで、混合物中のサンプルと標準物質の間の耐性を測定し、互換性チェックを行うことをお勧めしています。定量するためには、関連する信号が互いに重なり合ったり、可能性のある不純物と干渉したりしてはなりません。多くの場合、最も適した分析方法を見つけるために、溶媒と標準物質の組み合わせをいろいろと試す必要があります。

3. 計量計測

信頼性の高い計量値は、結果に直接影響するため必須であり、計量的な方法で実施することが推奨されています。マイクロ天秤または類似の天秤を使用することが成功の鍵となります。感度の低い天秤を使用すると、計量手順による不確かさの寄与が大きくなりますが、これは最終的にどのレベルの精度を達成すべきかによります。天秤は、安全キャビネット内にある 700kg の石製テーブルの上に置かれ、潜在的な静電気を除去するために U 字

型電極が設置されています。また、それらの配置は実験室のドアやエアコン等の空調による空気の変動を抑えることができます。各計量ステップと並行して気候条件をトレースし、その後の空気浮力の補正を可能にします。サンプルと標準物質は、NMR チューブに直接計量するのではなく、重水素化溶媒を加えた後に溶媒を再封することができる HPLC バイアルに計量します。また、静電気が発生する可能性があるため、バイアルやスパチュラはプラスチック製ではなく、ガラス製のものを使用します。

4. 機器の設定

シグマ アルドリッチは、Bruker の 5 mm BBO プローブヘッドを搭載した Avance III 600MHz の装置と 5mm CPP TCI プローブヘッドを搭載した Avance III 600MHz の装置を使用しています。高磁場、低磁場の装置のいずれも定量に適用することができます。30°パルスの代わりに90°パルスを用いると、SN比が向上し、アーチファクトが減少します。そのため高い精度が求められる場合で時間が問題にならない場合は、30°パルスの代わりに90°パルスを用いることをお勧めします。また、スペクトルを複雑にするスピニングサイドバンドを避けるために、スピニングはオフにします。

実際の qNMR 実験を開始する前に、混合物の T_1 緩和時間を決定する必要があります。これは一貫した結果を得るための最も重要な項目です。 T_1 は、180°パルスで反転した核スピンの静磁場方向に回復する過程の信号強度を90°パルスで測定する、反転回復法で測定できます。**5ページの表1**は、異なる重水素化溶媒中での **TraceCERT™** CRM の T_1 を示しています。 T_1 は、濃度、混合物、溶媒によって変化するため、例えば、相性チェックと同時に混合物中の緩和時間を評価することをお勧めします。 D_1 を算出するためには、混合溶液中の最も長い T_1 (緩和時間) に最低7の係数を乗じる必要があります。

5. スペクトル評価

FIDのゼロフィリングと指数関数的な計量の後、フーリエ変換を行います。位相補正とベースライン補正は、スペクトルを処理する上で重要な2つのステップです。正確な積分値を得るためには、自動化された手順に頼るのではなく、このプロセスを手動で行うことが望ましい。つまり、どちらの信号でも ^{13}C を含めるか、除外するかということです。この判断は、シグナルの形状や、目的のシグナルの近くにある潜在的な不純物に大きく依存します。

6. 含有量の算出

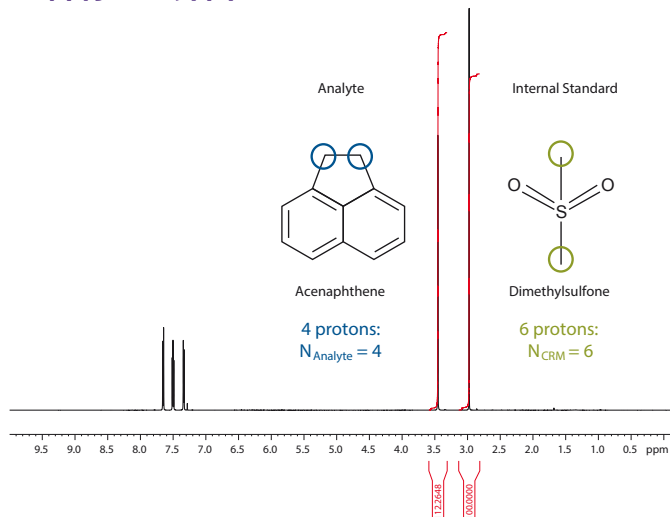


図 2: Example of a ^1H qNMR spectrum with internal standard calibration.

全体の測定不確かさに対する統計的な寄与を得るために、5～10回繰り返し測定を行うことをお勧めします。試料の定量は、NMR ピーク積分値と、試料および標準物質の初期重量、分子量、それぞれのシグナルに寄与するプロトン数、および標準物質の認証純度から直接計算されます。サンプルには分析対象物質に加えて潜在的な不純物が含まれているため、若干の違いがあり、式の中で下付きの文字で示されていることに注意してください。

$$P_{\text{Sample}} = \frac{I_{\text{Analyte}}}{I_{\text{CRM}}} \cdot \frac{N_{\text{CRM}}}{N_{\text{Analyte}}} \cdot \frac{M_{\text{Analyte}}}{M_{\text{CRM}}} \cdot \frac{m_{\text{CRM}}}{m_{\text{Sample}}} \cdot P_{\text{CRM}}$$

P_{Sample}	Purity of the sample as mass fraction
P_{CRM}	Purity of the CRM as mass fraction
I_{Analyte}	Integral of the analyte signal
I_{CRM}	Integral of the CRM signal
N_{Analyte}	Number of analyte protons (phosphorus nuclei, fluorine nuclei)
N_{CRM}	Number of CRM protons (phosphorus nuclei, fluorine nuclei)
M_{Analyte}	Molecular mass of the analyte
M_{CRM}	Molecular mass of the CRM
m_{Sample}	Mass of sample
m_{CRM}	Mass of CRM

さらに正確な結果を得るために、秤量値は、実験室の気候条件

や材料の密度によっては、空気の浮力を補正することができます。

7. 不確かさ

統計的な寄与 (Type A) の他にもいくつかの寄与 (Type B) があります。前のセクションで示した式に含まれるすべてのパラメータは、全体の測定不確かさに寄与しますが、その大きさは異なります。⁶低分子のプロトン数についてはゼロ、分子量や計量値については非常に小さく(使用する天秤に依存)、オペレータ個人の手法による寄与については中程度で、最大の寄与は、再現性や標準物質の純度によるものです。qNMR 測定におけるこれらの不確かさの要因に加えて、材料の均質性と安定性も評価しなければならず(ただしこれは認証標準物質生産者にのみ関係)、その結果、不確かさの計算に含まれる可能性のある分散分析 (ANOVA) データが得られます。

推奨される最小サンプル数は、証明書に記載されており、有効期限も明記されています。ほとんどの場合、測定の不確かさは $k=2$ の包含係数が用いられます。

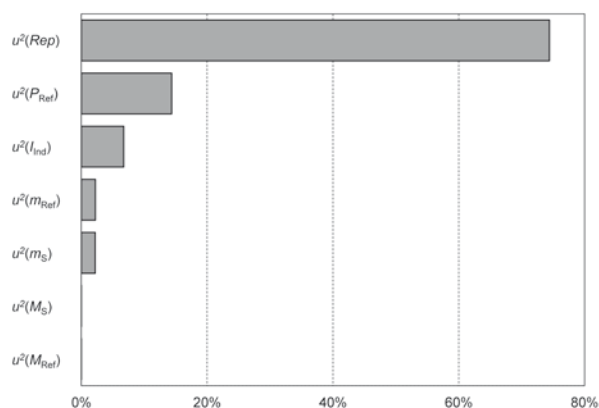


図 3: Overview on typical contributions to the relative standard uncertainty (relative squared contributions are given) for the quantification of tris(2-chloroethyl) phosphate using phosphonoacetic acid as internal standard in a ^{31}P qNMR measurement.

このように、いくつかの基本的なルールに従い、バランスよく測定することで、0.5～1%の測定不確かさで qNMR 測定を日常的に行うことができます。内部標準物質による影響を最小限に抑えるために、シグマ アルドリッチは *TraceCERT™* CRM を最適な条件で認証し、0.1%までの不確かさが全体の結果に影響しないようにしています³。

表1:TraceCERT™製品

¹H quantitative NMR, TraceCERT™

製品番号	Substance	D ₂ O			CDCl ₃			DMSO-d ₆			CD ₃ OD			CD ₃ CN		
		δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)
01380	Ethylene carbonate	4.5	5.5	>250	4.5	7.0	>250	4.5	2.7	>250	4.5	5.3	>250	4.5	2.0	>250
03826	Calcium formate	8.4	3.4	>250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06185	Benzoic acid	-	-	-	8.1	3.7	150	8.0	3.3	>250	8.0	4.3	>250	8.0	4.5	80
					7.7	4.0		7.6	3.7		7.6	4.4		7.7	2.5	
					7.5	3.4		7.5	3.0		7.5	3.9		7.5	2.6	
06856	Duroquinone	-	-	-	2.0	3.3	>250	2.0	3.1	30	2.0	4.0	10	2.0	5.4	20
07038	Dimethyl terephthalate	-	-	-	8.1	3.6	160	8.1	2.9	20	8.1	4.4	4.0	8.1	4.9	20
					4.0	1.8		3.9	1.1		4.0	2.4		3.9	2.6	
14659	Potassium hydrogen phthalate	7.5	2.5	>250*	-	-	-	-	-	-	7.9	2.5	5.0	-	-	-
40384	1,2,4,5-Tetrachloro-3-nitro-benzene	-	-	-	7.8	10.7	>250	8.5	12.6	>250	9.4	9.6	50	6.8	6.4	10
41867	Dimethyl sulfone	3.0	2.9	>250	3.0	2.7	80	3.0	2.4	>250	3.0	3.3	40	2.9	2.6	>250
42582	Ethyl 4 (dimethyl-amino) benzoate	-	-	-	7.9	3.8	>250	7.8	2.5	>250	7.9	3.4	>250	7.9	5.6	50
					6.7	2.4		6.7	1.4		6.7	2.5		6.7	3.7	
					4.3	2.8		4.2	1.9		4.3	3.3		4.3	4.1	
					3.1	2.0		3.0	1.5		3.0	2.2		3.0	3.6	
50409	Thymol	-	-	-	1.4	2.5	>250	1.3	2.1	>250	1.4	2.7	>250	1.3	3.6	>250
					7.1	3.8		7.0	2.0		7.0	3.7		7.1	4.9	
					6.8	4.5		6.7	2.2		6.6	4.4		6.7	5.7	
					6.6	4.8		6.5	2.6		6.5	5.8		6.6	5.7	
					3.2	4.3		3.1	2.3		3.2	4.0		3.2	5.2	
					2.3	3.1		2.2	2.0		2.2	2.8		2.2	3.5	
55177	Benzyl benzoate	-	-	-	1.3	1.9	>250	1.1	0.9	>250	1.2	1.8	>250	1.2	2.4	>250
					5.4	4.3		5.4	2.2		5.4	2.0		5.4	1.0	
74599	1,3,5-Trimethoxy-benzene	-	-	-	8.1	13.6	>250	8.0	8.8	>250	8.1	3.9	>250	8.1	2.4	>250
					6.1	4.7		6.1	3.2		6.1	4.8		6.7	3.4	
74658	1,2,4,5-Tetramethyl-benzene	-	-	-	3.8	2.2	>250	3.7	1.4	>250	3.8	2.7	>250	4.3	2.6	>250
					7.0	6.1		6.9	4.7		6.9	5.9		6.9	7.7	
89151	Dimethylmalonic acid	1.3	1.0	100	2.2	4.0	>250	2.1	2.6	10	2.2	4.3	10	2.2	5.0	50
					-	-		-	-		-	-		-	-	
92816	Maleic acid	6.3	6.1	>250	-	-	-	6.3	3.0	>250	6.3	3.9	10	6.4	2.3	20
94681	Methyl 3,5-dinitrobenzoate	-	-	-	9.3	8.0	>250	9.1	9.4	100	-	-	-	9.1	9.0	>250
					9.2	6.1		8.9	7.6		-	-		9.0	8.2	
					4.1	2.6		4.0	1.5		-	-		4.0	3.5	

³¹P quantitative NMR, TraceCERT™

製品番号	Substance	D ₂ O			CDCl ₃			DMSO-d ₆			CD ₃ OD			CD ₃ CN		
		δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)
05498	Triphenyl phosphate	-	-	-	-17.7	2.7	>250	-17.3	1.2	>100	-17.5	3.1	>10	-17	4.3	>250
92214	Potassium phosphate monobasic	0.08	8.0	>250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96708	Phosphonoacetic acid	15.7	4.6	>250	-	-	-	14.9	1.5	>250	17.7	2.9	>250	-	-	-

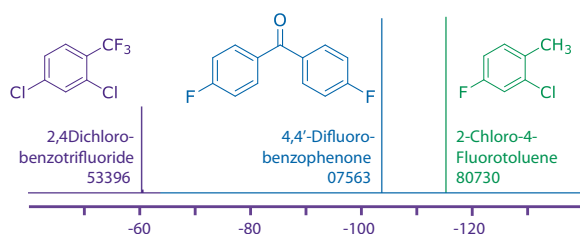
¹⁹F quantitative NMR, TraceCERT™

製品番号	Substance	D ₂ O			CDCl ₃			DMSO-d ₆			CD ₃ OD			CD ₃ CN		
		δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)	δ (ppm)	T1 (s)	s (mg/ml)
07563	4,4'-Difluoro-benzophenone	-	-	-	-105.8	2.4	>250	-106.5	1.4	150	-108.1	2.8	30	-108.3	2.3	140
53396	2,4-Dichloro-benzotrifluoride	-	-	-	-62.5	2.3	>250	-61.2	1.2	>250	-65.4	3.3	>250	-63	2.9	>250
80730	2-Chloro-4-fluorotoluene	-	-	-	-115.8	4.4	>250	-115.3	3.3	>250	-117.7	4.8	>250	-117.3	4.7	>250

Standards for ^1H quantitative NMR, TraceCERT®



Standards for ^{19}F quantitative NMR, TraceCERT®



Standards for ^{31}P quantitative NMR, TraceCERT®

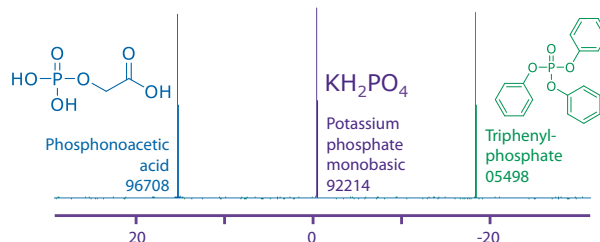


Figure 4: Example spectra for all TraceCERT™ CRMs for qNMR in organic solution and / or D_2O respectively

TraceCERT™ Certified Reference Materials for qNMR

Supelco では qNMR 用に設計された ^1H 、 ^{19}F 、 ^{31}P のための認証標準物質 (CRM/Certified Reference Material) を提供しています。すべての製品は、NIST (National Institute of Standards and Technology) SRM または NMIJ の標準物質にトレーサブルです。

ISO/IEC17025 と ISO Guide 34 の認定を受けた施設で製造され、達成可能な最高の品質レベルに相当します。分析証明書の例を図5に示し、最も重要な要素について解説しています。

お客様の qNMR タスクに最適な標準物質を選定の助に、本紙 5 ページ目の表1に、22種類の CRM の、シグナルのケミカルシフト、溶解度、緩和時間を掲載しています。また6ページの図4にスペクトルの例を示しています。

TraceCERT®
Traceable Certified Reference Materials

SIGMA-ALDRICH®

Certificate

This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31 [1].

Product name: **2,4-Dichlorobenzotrifluoride**

Product no.: **53396**

Lot no.: **BCBT0752**

Formula: **C₇H₃F₃Cl₂**

Molecular mass: **215.00 g/mol**

Traceability [2]: **NMIJ [3] CRM 4601-a**
(3,5-Bis(trifluoromethyl)benzoic acid)

Certificate issue date: **February 08, 2017**

Certificate version: **01**

Expiry date: **JAN 2019**

Traceability Statement

Expiry Date

Value (g/g)

Expanded Uncertainty (g/g)

2,4-Dichlorobenzotrifluoride

99.51 %

0.26 %

Expanded Uncertainty (g/g)

Minimum sample size: There is no recommended minimum sample weight. The substance is liquid at room-temperature and therefore homogeneous under these conditions. Potential inhomogeneity is covered by the expanded measurement uncertainty.

Intended use: Use this certified reference material (CRM) as internal standard for quantitative ^{19}F -NMR measurements only. The content of this CRM was determined by ^{19}F -qNMR spectroscopy.

Storage and handling: The CRM should be stored in the original bottle at room-temperature (20-25°C). After use the bottle should be tightly closed and protected from excessive moisture and light. Storage under Argon is recommended.

CRM operations: *A. Rück*

Certification body: *Dr. K.D. Schmidt*

Certification page 1 of 4

Sigma-Aldrich Production GmbH, Industriestrasse 25, 9471 Buchs/Schweizland, Tel: +41 81-756-2011, Fax: +41 81-756-5449

図 5: Example of a Certificate 94681 Methyl 3,5-dinitrobenzoate (first page)

References

1. F. Malz, H. Jancke, J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005), 813–23.
2. S.K. Bharti, R. Roy, Quantitative ^1H NMR spectroscopy, Trends Anal. Chem. 35(2012) 5–26.
3. M. Weber, C. Hellriegel, A. Rueck, R. Sauermoser, J. Wuethrich, Using high-performance quantitative NMR (HP-qNMR®) for certifying traceable and highly accurate purity values of organic reference materials with uncertainties <0.1 %, Accred. Qual. Assur. 18 (2013), 91–98.
4. T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose, T. Hirai, A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance, Accred. Qual. Assur. 14 (2009) 79–86.
5. T. Ihara, T. Saito, N. Sugimoto, Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in food and the environment, Synthesiol. Engl. Ed. 2 (2009) 12–22.
6. Eurachem/CITAC Guide, 2nd Ed. (2000), "Quantifying uncertainty in analytical measurement."
7. M. Weber, C. Hellriegel, A. Rueck, J. Wuethrich, P. Jenks, Using high-performance ^1H NMR (HP-qNMR®) for the certification of organic reference materials under accreditation guidelines - Describing the overall process with focus on homogeneity and stability assessment, JPBA 93 (2014), 102–110.
8. M. Weber, C. Hellriegel, A. Rueck, J. Wuethrich, P. Jenks, M. Obkircher, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2015), 407(11), 3115–3123.



メルクライフサイエンス公式 SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格(税別)です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2021年5月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Supelco are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.sigmaaldrich.com/japan

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ
E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ
E-mail: sialjpcs@merckgroup.com Tel: 03-6756-8275 Fax: 03-6756-8301

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

AAM107-2105-PDF-E